



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 7/48, 35/78	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/32163 (43) Date de publication internationale: 8 juin 2000 (08.06.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02925</p> <p>(22) Date de dépôt international: 26 novembre 1999 (26.11.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/15162 27 novembre 1998 (27.11.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): GATTE-FOSSE S.A. [FR/FR]; 36, chemin de Genas, F-69800 Saint Priest (FR).</p> <p>(72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): LAFORÊT, Jean-Pierre [FR/FR]; 14, rue A. Bonnet, F-69740 Genas (FR).</p> <p>(74) Mandataires: VUILLERMOZ, Bruno etc.; Cabinet Laurent & Charras, 20, rue Louis Chirpaz, Boîte postale 32, F-69131 Ecully (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>
<p>(54) Title: WALNUT SEED MEAL EXTRACT</p> <p>(54) Titre: EXTRAIT DE TOURTEAU DE GRAINES DE NOIX</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a meal extract of walnut seeds produced by a Juglans genus walnut tree obtainable by a step consisting in an aqueous maceration followed by a step of concentration.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>Extrait de tourteau de graines de noix produites par un noyer du genre Juglans, susceptible d'être obtenu par une étape de macération aqueuse dudit tourteau, puis une étape de concentration.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

EXTRAIT DE TOURTEAU DE GRAINES DE NOIX

L'invention se rapporte à un extrait de tourteau de graine de noix. Elle
5 concerne également une composition cosmétique comprenant ledit extrait. Elle a
aussi pour objet différentes applications de l'extrait et donc de la composition
cosmétique.

Dans la suite de la description et dans les revendications, on désigne par
10 « tourteau de graine de noix », le résidu de pressage de la graine de la noix après
extraction de l'huile qu'elle contient communément appelée « huile de noix ».

Les noyers appartenant à la famille des juglandacées sont largement répandus
et cultivés dans les pays tempérés. Il s'agit notamment du *Juglans regia* présent en
15 Europe ou encore du *Juglans nigra* présent en Amérique, lesquels font l'objet d'un
certain nombre d'applications.

On a ainsi décrit, dans le document RO-A-103 270, une composition
cosmétique utilisée pour le lavage des cheveux et comprenant en combinaison un
20 salicylate et un extrait alcoolique de noyer du type *Juglans regia*. Toutefois, rien
n'est indiqué concernant la partie de l'arbre à partir de laquelle l'extrait est obtenu.

On a également décrit, dans le document EP-A-0 306 853, une composition
cosmétique présentant des propriétés germicides contenant des extraits d'écorces de
25 racines d'arbres de la famille des juglandacées.

De même, on a identifié certaines parties de la noix comme présentant des
propriétés intéressantes.

30 C'est par exemple le cas du brou de noix constituant la partie charnue externe
de la noix, lequel contient un composé naphtoquinonique (le juglone) utilisé
comme teinture capillaire.

En revanche, le résidu de pressage de la graine de la noix constituant le tourteau n'a jamais été valorisé et n'a par conséquent pas reçu d'application particulière.

- 5 Le Demandeur a cherché à isoler un extrait de tourteau de graine de noix et a constaté qu'il présentait un certain nombre de propriétés intéressantes.

L'invention concerne donc un extrait de tourteau de graine de noix produites par un noyer du genre *Juglans* susceptible d'être obtenu par une étape de
10 macération aqueuse dudit tourteau, puis une étape de concentration.

Avantageusement, la concentration est effectuée par osmose inverse.

- Par ailleurs et en pratique, la macération est effectuée à une température
15 comprise entre 3 et 10° C, avantageusement 4° C. Une température inférieure à 4°C est trop froide et peut provoquer la formation de glace. Une température supérieure à 4° C est au contraire trop élevée et risque de provoquer la dégradation de l'activité de l'extrait.

- 20 L'extrait obtenu se présente sous forme d'une solution aqueuse concentrée.

Pour obtenir l'extrait sous forme de poudre, on fait suivre l'étape de concentration par une étape de séchage ou de lyophilisation.

- 25 Avantageusement, les noix dont est issu l'extrait de tourteau sont produites par un noyer commun (*Juglans regia*).

Comme déjà dit, l'extrait de tourteau de noix de l'invention présente un certain nombre de propriétés intéressantes de sorte qu'il peut être utilisé pour
30 différentes applications, notamment au sein de compositions cosmétiques.

1/ Activité protectrice de l'extrait de tourteau de graine de noix vis-à-vis de l'oxydation intracellulaire provoquée par un stress oxydatif du type UVB

L'approche expérimentale utilisée pour cette évaluation est basée sur la mesure du taux d'oxydation intracellulaire, après exposition aux UVB de keratinocytes humains cultivés en absence et en présence de l'extrait de l'invention.

Méthodes

Des kératinocytes humains normaux isolés à partir de peaux de pr puc s obtenues lors d'interventions chirurgicales sont cultivés en milieu KGM "serum free"   37  C, en atmosphère humide air-CO  (95-5 %).

Après étude de cytotoxicité, trois concentrations d'extrait ont été retenues pour l'évaluation : 10  g/ml, 100  g/ml, 250  g/ml.

Principe du test

Le principe du test est basé sur la mesure du degré d'oxydation intracellulaire à l'aide d'une sonde spécifique : DCFH-DA (2', 7' - trichlorodihydrofluoresce ne diacétate).

Le DCFH-DA, sonde non fluorescente, pénètre par diffusion passive à l'intérieur des cellules. Après clivage des groupements acétate par les estérases intracellulaires, le DCFH s'accumule au niveau du cytosol. L'oxydation intracellulaire du DCFH par différentes Espèces Oxygénées Réactives (EOR) conduit à la formation d'un produit fluorescent.

La mesure des intensités de fluorescence permet d'évaluer le degré d'oxydation des cellules soumises à un stress oxydatif.

Après avoir été détachées de leur support, les suspensions de keratinocytes sont ensemencées dans des plaques 24 cupules. Les cellules sont incubées à 37  C pendant 24 heures, avec le milieu contenant l'extrait à l'étude.

Après incubation avec les différentes concentrations d'extrait à tester, les cultures sont rincées à l'aide d'une solution de PBS, puis exposées aux UVB à travers une solution de PBS.

- 5 Après irradiation des cellules, la solution de PBS est remplacée par une solution de DCFH-DA. Après incubation de la sonde fluorescente, les tapis cellulaires sont abondamment rincés au PBS, puis les cellules sont remises à incuber à 37° C pendant 24 heures avec du milieu de culture neuf.
- 10 En fin d'essai, les kératinocytes mis en suspension sont transférés dans des cuves thermostatées et les intensités de fluorescence (Abs = 502 nm, Em = 520 nm) sont mesurées et exprimées en pourcentage par rapport aux cultures contrôles non irradiées.
- 15 Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant :

	Degré d'oxydation	Activité protectrice
Témoin		
- pas UV	100	-
- 25 mJ/cm ²	144	-
- 50 mJ/cm ²	176	-
10 µg/ml		
- pas UV	100	-
- 25 mJ/cm ²	116	39
- 50 mJ/cm ²	125	65
100 µg/ml		
- pas UV	100	-
- 25 mJ/cm ²	107	74
- 50 mJ/cm ²	115	79
250 µg/ml		
- pas UV	100	-
- 25 mJ/cm ²	98	104
- 50 mJ/cm ²	106	92

Dans les conditions de cette étude, l'extrait de l'invention protège de manière dose dépendante la cellule vis-à-vis du stress oxydatif induit par irradiation UVB. L'extrait est donc capable de réguler le taux d'espèces oxygénées réactives (EOR) qui se forment. L'extrait possède la capacité de protéger la cellule du stress oxydatif, c'est-à-dire de bloquer la formation de EOR et/ou d'inhiber leur réactivité par un processus de "piégeage".

Dans une première application, l'extrait de l'invention peut donc être utilisé pour protéger les cellules cutanées du stress oxydatif induit par irradiation UVB.

2/ Activité protectrice des cellules vis-à-vis de l'apoptose induite par les radiations UVB

Les EOR capables de réagir directement avec l'ADN peuvent introduire au niveau de ce constituant de multiples modifications chimiques. Ces modifications, qui ont pour conséquence une perturbation du programme génétique de la cellule, sont dans l'ensemble corrigées par des enzymes dites de réparation.

Toutefois, lorsque cette réparation n'est pas totale, la cellule rentre dans un programme de mort cellulaire programmée ou apoptose conduisant à leur élimination.

Evaluation de l'activité protectrice des cellules vis-à-vis de l'apoptose induite par les radiations UVB

Ce pouvoir protecteur vis-à-vis de l'apoptose induite par les UVB a été évalué sur cultures de keratinocytes monocouches, par détermination du pourcentage de cellules apoptotiques au moyen du kit APOPTAG ® (test semi-quantitatif).

Méthode

Les keratinocytes sont obtenus à partir de cultures primaires de prépuces et sont mis à proliférer dans un milieu conditionné (KGM) "serum free".

Après avoir été détachées de leur support, les suspensions de keratinocytes sont mises en culture dans des plaques 24 puits. Les cellules sont cultivées dans du milieu Iscove complémenté par des antibiotiques et du sérum de veau foetal (5 %). Elles sont mises en présence de l'extrait de l'invention pendant 24 heures à deux concentrations (10 et 100 µg/ml), puis stimulées par des radiations UVB.

Le nombre de cellules apoptotiques est déterminé 72 heures après irradiation en milieux traités et non traités en utilisant le kit APOPTAG ®. Les cassures d'ADN sont visualisées par émission de fluorescence. Le nombre de cellules en apoptose est évalué par comptage du nombre de cellules fluorescentes sur un total de 200 cellules.

Le pourcentage de réduction des cellules apoptotiques sous l'action de l'extrait de l'invention est déterminé.

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Extrait de l'invention (µg/ml)	Pourcentage de cellules apoptotiques induit par les UV
0	70
10	55
100	49,5

Sous l'influence de l'extrait de l'invention, le taux de cellules apoptotiques engendré par les UV (70 %) est réduit de manière dose dépendante.

Les résultats de cette étude démontrent que l'extrait de l'invention possède des propriétés antiapoptotiques à faibles concentrations, consécutives à sa capacité à limiter la formation et/ou l'action des EOR.

3/ Activité anti-inflammatoire de l'extrait de tourteau de graine de noix de l'invention

In vivo, les stress environnementaux et notamment les UV, en stimulant la
5 formation de radicaux libres, favorisent l'expression de nombreux médiateurs
épidermiques, capables de conditionner le développement d'une inflammation.

Le Demandeur a constaté que l'extrait de tourteau de graine de noix était
efficace pour limiter le développement de la réaction inflammatoire.

10

Cette activité a été évaluée in vitro sur des kératinocytes et des macrophages.

Les kératinocytes sont obtenus à partir de cultures primaires de prépuces et
sont mis à proliférer dans un milieu conditionné pendant deux semaines. Au terme
15 de cette période, les kératinocytes sont mis en culture dans des plaques 24 puits.

Les macrophages sont obtenus à partir de prélèvements sanguins après
centrifugation. Après traitement usuel, ils sont mis à adhérer sur boîte de Pétri.

20 On teste l'extrait de l'invention à une concentration déterminée. Un lot de
culture témoin, non traité par l'extrait de l'invention est mené en parallèle.

Les kératinocytes et les macrophages obtenus sont ensuite soumis aux deux
stimuli suivants.

25

Le premier stimulus consiste à déclencher une réaction inflammatoire
spécifique en activant les kératinocytes et les macrophages par de l'IL₄ (10
nanogrammes par millilitre) pendant 48 heures, afin d'induire la production de
CD23 (récepteur de basse affinité pour les IgE), lesquels sont ensuite activés par
30 les complexes immuns à IgE.

Le second stimulus consiste à déclencher dans les cellules une réaction
inflammatoire non spécifique en activant les kératinocytes et les macrophages par
un mélange IFN γ (1000 unités par millilitre) et d'extrait de lipopolysaccharide
35 LPS (10 microgrammes par millilitre).

Les cellules ainsi stimulées sont maintenues en culture pendant 48 heures avant de prélever les surnageants qui sont ensuite testés par colorimétrie ou méthode ELISA pour déterminer leur contenu respectif en dérivés nitrés (NO) et en $\text{TNF}\alpha$, constituant les médiateurs pro-inflammatoires.

5

Les résultats du test sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Stimulation par les IgE (IL_4)		$\text{TNF}\alpha$ (pg/ml)	NO(μM)
Kératinocytes	Témoin	275 ± 16	9 ± 2
	Extrait de l'invention (1/100 V/V)	102 ± 11	$0,5 \pm 0,1$
Macrophages	Témoin	985 ± 85	5 ± 1
	Extrait de l'invention (1/100 V/V)	125 ± 15	non détectable
Stimulation par $\text{IFN } \gamma$ /LPS			
Kératinocytes	Témoin	775 ± 45	19 ± 3
	Extrait de l'invention (1/100 V/V)	302 ± 17	$2,4 \pm 0,8$

Les résultats de ce test démontrent la capacité de l'extrait de l'invention à
10 moduler la libération des médiateurs pro-inflammatoires en réponse à divers stimuli.

En effet, dans le cas d'une inflammation dépendante des IgE, déclenchée par IL_4 , l'extrait de l'invention présente une activité anti-inflammatoire sur les
15 kératinocytes (diminution de la synthèse de NO et de $\text{TNF}\alpha$). On note une activité renforcée du même type sur les macrophages.

Dans le cas d'une inflammation non spécifique déclenchée par l'association $\text{IFN}\gamma$ /LPS, seuls les kératinocytes sont à même de produire à la fois des $\text{TNF}\alpha$ et
20 des dérivés nitrés. Dans ce cas précis, l'extrait de l'invention présente également une activité anti-inflammatoire significative.

L'extrait de l'invention pourra être avantageusement incorporé dans des compositions cosmétiques destinées à être appliquées sur des peaux sensibles, qui sont des peaux hyper-réactives et donc très réceptives aux stress environnementaux, tels que les radiations UV, les agents chimiques irritants, les chocs thermiques, la pollution, les agents allergiques, etc...

Dans ce cas, on pourra protéger la peau de tous stress environnemental et notamment du rayonnement UV selon un procédé consistant à appliquer sur la peau une quantité efficace de l'extrait de l'invention ou d'une composition comprenant ledit extrait.

L'extrait de l'invention peut également être incorporé dans des compositions cosmétiques ayant un potentiel irritant comme celles comprenant des agents tensio-actifs ou des α -hydroxyacides, afin de limiter l'impact de certaines réactions proinflammatoires liées à ces composants.

4/ Activité anti-âge de l'extrait de tourteau de graine de noix de l'invention vis à vis de la peau

On a également constaté que l'extrait de tourteau de graine de noix de l'invention était efficace dans la lutte contre le vieillissement de la peau de par son activité :

- stimulante de la synthèse protéique des kératinocytes de l'épiderme et fibroblastes du derme ;
- anti-collagénasique ;
- anti-élastasique.

L'extrait peut donc être utilisé dans des compositions cosmétiques destinées à lutter contre le vieillissement de la peau.

Le vieillissement de la peau résulte d'une sénescence programmée conduisant à une atrophie du tissu cutané, qui apparaît particulièrement prononcé au niveau du derme. Cette atrophie provient d'un ralentissement du métabolisme cellulaire et est à l'origine de l'apparition notamment de rides.

Le derme est un tissu conjonctif composé d'une matrice extracellulaire (MEC) synthétisée par les fibroblastes. La MEC, responsable des propriétés mécaniques de la peau, est constituée de différentes protéines, dont le collagène (type I et type III) l'élastine et les glycosaminoglycanes (essentiellement acide hyaluronique et dermatane sulfate).

Au cours du temps, s'instaure une altération autant qualitative que quantitative de la matrice extra-cellulaire. Cette altération se traduit par une dégénérescence du réseau collagénique, du réseau élastique et par une diminution de la teneur en glycosaminoglycanes et plus particulièrement en acide hyaluronique. Ces modifications résultent à la fois d'une diminution de la capacité des fibroblastes à synthétiser la matrice extracellulaire, et d'un déséquilibre dans l'expression de certaines protéinases, notamment les protéinases dites Matrix Métallo protéinases et les protéinases dites Tissu Inhibitor Métallo Protéinases.

De la sorte, au cours du vieillissement, les propriétés mécaniques de la peau régressent et on observe une diminution de la force de tension ou de la rigidité (perte du réseau collagénique), une diminution de l'élasticité et de la résilience (dégénérescence du réseau élastique), le tout accompagné d'un effondrement de l'hydratation (baisse du taux d'acide hyaluronique) à l'origine d'une perte de la turgescence dermique.

Des tests ont été réalisés pour démontrer l'activité anti-âge de l'extrait de l'invention vis à vis de la peau.

- activité stimulante de l'extrait de l'invention sur la synthèse protéique des kératinocytes de l'épiderme et des fibroblastes du derme humain

a) Cytotoxicité

On a tout d'abord réalisé un essai de cytotoxicité de l'extrait de l'invention sur des fibroblastes pour déterminer la dose maximale d'extrait n'entraînant pas la cytotoxicité.

La viabilité cellulaire est évaluée, en fin d'essai, par un test colorimétrique au MTT. Le principe de ce test résulte de la transformation, par la succinyl

déshydrogénase mitochondriale des cellules métaboliquement actives, du 3(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (substrat soluble jaune à l'état oxydé) en formazan bleu-violet. La densité optique de la solution bleu-violet obtenue en fin d'essai est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

5

On a évalué la cytotoxicité de l'extrait de l'invention à partir de neuf concentrations différentes d'extrait comprises entre 0,01 et 10 mg/ml. Une première évaluation a été effectuée après 24 heures.

10 On a réalisé une seconde évaluation après 48 heures sur des concentrations comprises entre 0,05 et 5 mg/ml.

Les résultats figurent dans le tableau ci-après.

Concentration mg/ml	0,1	0,25	0,5	0,75	1	2,5	5	10
Viabilité (24 h)	108 %	non déterminé	112 %	non déterminé	107 %	non déterminé	80 %	68 %
Viabilité (48 h)	110 %	109 %	107 %	99 %	94 %	77 %	53 %	non déterminé

15

Après 24 heures de contact, les concentrations d'extrait inférieures ou égales à 1 mg/ml n'induisent aucune diminution significative de la réponse cellulaire vis-à-vis du MTT. De même, les résultats après 48 heures confirment la non toxicité des concentrations inférieures ou égales à 1 mg/ml. De la sorte, la concentration en
20 extrait de tourteau de graine de noix de 1 mg/ml a été retenue comme dose maximale non cytotoxique pour la suite de cette étude.

b) Etude sur les kératinocytes de l'épiderme

25 On cultive des kératinocytes en monocouches. A J-1, les kératinocytes sont détachés de leur support par trypsination douce. Après centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans un milieu de culture optimal. Les suspensions cellulaires sont ensuiteensemencées.

24 heures après ensemencement (J_0), les milieux de culture sont éliminés et remplacés par un milieu contenant différentes concentrations d'extrait de tourteau de graine de noix.

5

Une fois traitées, les kératinocytes sont replacés à l'étuve à 37° C et incubés pendant 72 heures en atmosphère air-CO₂ (95/5 %).

On réalise en fin d'essai un dosage de protéines cellulaires totales par la méthode au bleu de Coomassie. Ce test consiste tout d'abord à rincer en fin de traitement les cellules avec du PBS. On ajoute ensuite une solution de NaOH (50 µl) dans chaque puits. Après 10 minutes d'incubation, 200 µl d'une solution diluée de Biorad est ajoutée dans chacun des puits. On mesure ensuite l'absorbance des solutions à 570 nanomètres après cinq minutes d'incubation. On construit parallèlement une gamme étalon à l'aide de BSA (Bovine Serum Albumin) permettant de transformer les densités optiques obtenues en équivalents microgrammes de protéines par puits.

Diverses concentrations d'extrait de tourteau de noix ont ainsi été testées respectivement 0,1 mg/ml et 0,25 mg/ml dans le milieu suboptimal. On a également réalisé un lot témoin suboptimal et un lot témoin optimal.

Le dosage des protéines s'est fait à J_0 et à J_3 . On a reproduit les résultats dans le tableau ci-dessous.

25

	Protéines (µg/puits)	
	J_0	J_3
Témoin optimal	3,04	17,70
Témoin suboptimal	3,04	13,93
Concentration 0,1 mg/ml	3,04	19,81
Concentration 0,25 mg/ml	3,04	19,33

On observe une très nette augmentation de la masse de protéines cellulaires au niveau des kératinocytes traitées avec l'extrait de l'invention.

De la sorte, l'extrait de l'invention a donc bien un effet stimulant du métabolisme cellulaire, c'est-à-dire de la synthèse protéique des kératinocytes.

5 c) Etude sur les fibroblastes

On a étudié dans ce test les effets de l'extrait de l'invention sur l'incorporation de leucine dans différentes fractions protéiques néosynthétisées par des fibroblastes humains en culture monocouche.

10

Après culture des fibroblastes dermiques humains jusqu'à confluence des cellules, on change le milieu de culture par un milieu contenant 2 % de SVF (Sérum de Veau Foetal) avec :

- soit l'extrait de l'invention à 4 concentrations différentes respectivement
- 15 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml et 0,01 mg/ml ;
- soit de la vitamine C (produit de référence).

Un lot de culture témoin non traité est mené en parallèle.

20 Après 24 heures d'incubation à 37° C, on ajoute de la leucine marquée (³H leucine) dans le milieu de culture et on laisse incuber 48 heures supplémentaires. On recueille séparément :

- d'une part, le milieu de culture,
- d'autre part, le lysat des cellules après lyse cellulaire,
- 25 • et enfin la fraction insoluble (membranes, matrice déposée).

Les macromolécules sont extraites puis on mesure par scintillation liquide l'incorporation du précurseur radioactif de ces molécules.

30

35

Les résultats figurent dans le tableau ci-dessous.

Macromolécules extraites du milieu de culture

Traitement	coups/minute	% Témoin	P (significativité)
Témoin	26257 ± 3567	100	-
Vitamine C	34748 ± 2599	132	< 0,05
Extrait de l'invention			
0,25 mg/ml	34088 ± 1971	130	< 0,05
0,1 mg/ml	32572 ± 4184	124	> 0,05
0,05 mg/ml	28512 ± 2771	109	> 0,05
0,01 mg/ml	27664 ± 2519	105	> 0,05

5

Macromolécules extraites du milieu intracellulaire

Traitement	coups/minute	% Témoin	P (significativité)
Témoin	37298 ± 2213	100	-
Vitamine C	35953 ± 4349	96	> 0,05
Extrait de l'invention			
0,25 mg/ml	42786 ± 5990	115	> 0,05
0,1 mg/ml	43571 ± 3921	117	> 0,05
0,05 mg/ml	41530 ± 2844	111	> 0,05
0,01 mg/ml	45199 ± 1675	121	> 0,05

10

Fraction insoluble (matrice, membranes)

Traitement	coups/minute	% Témoin	P (significativité)
Témoin	50372 ± 7511	100	-
Vitamine C	56865 ± 3853	113	> 0,05
Extrait de l'invention			
0,25 mg/ml	65854 ± 5154	131	< 0,01
0,1 mg/ml	64060 ± 983	127	< 0,05
0,05 mg/ml	54621 ± 5542	108	> 0,05
0,01 mg/ml	56352 ± 86	112	> 0,05

5

Total

Traitement	coups/minute	% Témoin	P (significativité)
Témoin	113928 ± 12162	100	-
Vitamine C	127566 ± 10289	112	> 0,05
Extrait de l'invention			
0,25 mg/ml	142737 ± 5090	125	< 0,01
0,1 mg/ml	140204 ± 8253	123	< 0,01
0,05 mg/ml	124663 ± 7706	109	> 0,05
0,01 mg/ml	129216 ± 2953	113	> 0,05

10 On constate que l'extrait à une concentration de 0,25 mg/ml a stimulé de façon significative l'incorporation de leucine dans la fraction protéines sécrétées solubles (identique au produit de référence vitamine C).

On observe également qu'à une concentration de 0, 1 mg/ml, l'extrait stimule encore l'incorporation de leucine dans cette fraction.

- 5 De même, l'activité stimulante de l'extrait de l'invention à 0,25 mg/ml et 0,1 mg/ml a été observée dans la fraction protéines insolubles.

En revanche, on note que l'extrait de l'invention ne modifie pas significativement l'incorporation de leucine dans la fraction cellulaire soluble, ce
10 qui confirme que l'extrait de stimule pas la multiplication des fibroblastes en culture.

En conclusion, l'extrait de l'invention stimulant l'incorporation de leucine par les fibroblastes, on en déduit que l'extrait augmente significativement la synthèse
15 des protéines et plus spécifiquement les protéines sécrétées par les fibroblastes, à savoir les protéines de la matrice extracellulaire (collagènes, glyco-saminoglycanes,...).

• activité anti-élastasique de l'extrait de l'invention

20

Cette activité est évaluée sur des extraits cellulaires de fibroblastes de derme humain, isolés à partir de peau de prépuce et cultivés selon les techniques de routine à 37° C, en atmosphère humide air-CO₂ (95/5 %).

- 25 Les fibroblastes sont cultivés en milieu DMEM supplémenté en sérum de veau foetal (SVF 10 %) et passés régulièrement jusqu'à obtention d'une biomasse suffisante.

Pour réaliser le test, les cellules sont décollées de leur support par
30 trypsination. Après centrifugation et traitement adéquat, on récupère les extraits cellulaires.

L'activité élastase des extraits cellulaires a été évaluée en utilisant comme substrat le Suc-(L-Ala)₃-p Nitroanilide (SANA). Des aliquots de l'extrait cellulaire
35 sont pré-incubés à 37° C dans du tampon TEA (triethanolamine) à pH = 7,8, seul ou dans du tampon contenant différentes concentrations d'extraits.

Après incubation, une solution de SANA est ajoutée au mélange réactionnel. L'activité catalytique de l'extrait cellulaire est appréciée en mesurant le taux de libération de p Nitroanilide, lequel présente un maximum d'absorption à 405 nm.

5

Les densités optiques à 405 nm sont enregistrées pendant 1 heure 30 à 2 heures.

Les effets de l'extrait de l'invention sur l'activité élastasique ont été étudiés pour cinq concentrations différentes, respectivement 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml et 10 mg/ml. Un contrôle positif a été introduit dans l'essai (dichloroisocoumarine à 2 mM).

On a regroupé les résultats dans le tableau suivant.

15

	Témoin	0,5	1	2	5	10	DCI
mU elastase/10 ⁶ cell	0,682	0,577	0,503	0,424	0,332	0,310	0,431
Inhibition	-	15,3	26,3	37,7	51,4	54,7	37

Les résultats obtenus montrent que l'extrait de l'invention est capable d'inhiber de manière dose dépendante l'activité élastasique.

20

Dans les conditions expérimentales retenues, la concentration inhibitrice 50 de l'extrait a été évaluée à 5,6 mg/ml.

- activité anti-collagénasique de l'extrait de l'invention

25

On a étudié l'effet de l'extrait de l'invention sur l'activité anticollagénase.

Cette activité a été évaluée par la méthode de la fluorescamine.

Le test est basé sur la formation de composés fluorescents entre la fluorescamine et les amines primaires, les acides aminés et les peptides. En pratique, on mesure l'augmentation de l'émission de fluorescence obtenue après incubation d'une solution de collagène de type I et de collagénase en présence de fluorescamine.

L'évaluation de l'activité catalytique de la collagénase se fait en absence ou en présence de différentes concentrations de l'extrait, respectivement pour 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml et 10 mg/ml.

Les résultats sont reproduits dans le tableau ci-après.

Concentration mg/ml	Inhibition
0,5	6,4 %
1	6,6 %
2	12,6 %
5	19,5 %
10	17,2 %

Comme le montrent les résultats, on observe un effet inhibiteur de l'activité collagénasique.

Comme déjà dit, l'invention concerne également une composition cosmétique comprenant un extrait de tourteau de graine de noix tel que décrit précédemment.

Pour obtenir une composition cosmétique présentant les propriétés précitées, l'extrait de tourteau de l'invention est utilisé sous forme d'une solution de concentration comprise entre 10 et 40 grammes de matière sèche par litre de solvant, avantageusement 30 g/l.

En pratique, la composition contient entre 0,5 et 10 %, avantageusement entre 2 et 5 % en poids de la solution d'extrait de l'invention précitée de tourteau de

graine de noix. Bien entendu, l'extrait sera incorporé dans la composition cosmétique avec tout excipient usuel de formulation.

La composition cosmétique pourra notamment se présenter sous forme de
5 crème, lait, gel, sérums, microémulsions ou autre.

Comme déjà dit, cette composition pourra être utilisée en cosmétique pour le traitement du vieillissement cutané ou encore comme protecteur de la peau contre les stress environnementaux, induits notamment par les rayonnements UV.

10

L'invention concerne enfin un procédé de traitement cosmétique de lutte contre le vieillissement de la peau, caractérisé par le fait qu'il consiste à appliquer sur la peau une quantité efficace de la composition cosmétique décrite ci-avant.

15

Les avantages de l'invention ressortiront mieux des exemples de réalisation qui suivent.

Exemple 1

Formulation d'une crème protectrice à base de l'extrait de l'invention

20

On prépare les cinq phases suivantes :

Phase I

	Plurol ® stéarique	5 %
25	Alcool cétylique	2 %
	Myristate d'octyldodécyle	3 %
	Labrafac ® lipophile WL 1349	3 %
	Ceraphyl 368	4 %
	Dimethicone	5 %
30	Huile de Camellia	3 %
	Phenonip	0,5 %

Phase II

	Eau déminéralisée	35 %
35	Avicel RC 591	1 %

Phase III

Eau déminéralisée	qsp
Ultrez 10	0,15 %
Hydroxyde de sodium (10 % solution)	0,3 %

5

Phase IV

Dow coming 1403	2 %
-----------------	-----

Phase V

10	Solution d'extrait de l'invention (30 g/l)	3 %
----	--	-----

La fabrication de la crème est réalisée selon le procédé suivant.

On disperse tout d'abord l'Avicel RC 591 dans l'eau. On saupoudre ensuite
15 l'Ultrez 10 dans l'eau. On neutralise avec l'hydroxyde de sodium. On ajoute alors
sous agitation les phases II et III chauffées préalablement à 55° C dans la phase I
chauffée à 75° C. On refroidit sous agitation le mélange et vers 50° C, on ajoute la
phase IV. Sous agitation, on ajoute la phase V à une température voisine de 35° C.

20

Exemple 2Formulation d'une crème anti-âgePhase I

25	Apifil ®	8 %
	MOD	10 %
	ISIS	10 %
	Phenonip	0,6 %

30

Phase II

Eau déminéralisée	qsp
Carbopol 934	0,2 %

Phase III

35	Hydroxyde de sodium (10 % solution)	0,4 %
----	-------------------------------------	-------

Phase IV

Transcutol ® CG	5 %
Solution d'extrait de l'invention (30 g/l)	5 %
Parfum	qsp

5

La fabrication de la crème anti-âge est réalisée selon le procédé suivant.

On disperse tout d'abord le Carbopol dans la phase II. On ajoute ensuite sous agitation la phase II chauffée à 75° C dans la phase I chauffée également à 75° C.

10 On ajoute l'hydroxyde de sodium. Toujours sous agitation, on refroidit le mélange et à une température voisine de 30° C, on ajoute les autres constituants.

Exemple 315 Formulation d'un gel moussant pour peaux sensiblesPhase I

Oronal LCG	20 %
Oronal BLD	20 %
20 Amonyl 440 NI	10 %
Oramide DL 200	1,8 %
Softcutol ® O	1 %
Phenonip	0,5 %
Parfum	0,5 %

25

Phase II

Eau déminéralisée	qsp
Solution d'extrait de l'invention (30 g/l)	2 %

30

Phase III

Acide citrique (50 % solution)	0,07 %
--------------------------------	--------

La fabrication du gel moussant est réalisée selon le procédé suivant.

35 A froid, on mélange tous les constituants de la phase I dans l'ordre de la formule. On ajoute ensuite les phases II et III sous agitation lente.

Exemple 4Formulation d'un lait après-solaire

5	<u>Phase I</u>	
	Tefose ® 2000	7 %
	Alcool cétylique	2 %
	Geleol	1 %
	ISIS	5 %
10	MOD	5 %
	Diméthicone	2 %
	<u>Phase II</u>	
	Eau déminéralisée	qsp
15	Carbopol 941	0,1 %
	Solution d'extrait de l'invention (30 g/l)	5 %
	<u>Phase III</u>	
20	Hydroxyde de sodium (10 % solution)	0,2 %
	<u>Phase IV</u>	
	Parfum	0,2 %
	Germaben II	1 %
25	Le lait après-solaire est fabriqué selon le procédé suivant.	

On disperse tout d'abord le Carbopol dans l'eau. On ajoute ensuite sous agitation la phase II chauffée à 75° C dans la phase I chauffée à la même température. On incorpore ensuite la solution d'hydroxyde de sodium. Enfin, toujours sous agitation, on refroidit à une température voisine de 30° C et on ajoute les autres constituants.

Les avantages de l'invention ressortent bien de la description. On notera en particulier la capacité de l'extrait de tourteau de graine de noix à stimuler la synthèse protéique, notamment au sein des cellules du derme et de l'épiderme, de

sorte à agir contre le vieillissement cutané. On note également son activité anti-inflammatoire, et protectrice vis-à-vis des "stress environnementaux" et notamment des UV engendrant des effets délétères cumulatifs.

- 5 Ces différentes applications font de l'extrait de tourteau de graine de noix un actif complet destiné à lutter non seulement contre le vieillissement intrinsèque en stimulant le métabolisme cellulaire, mais également extrinsèque par son activité protectrice.

REVENDEICATIONS

- 1/ Extrait de tourteau de graine de noix produites par un noyer du genre Juglans, susceptible d'être obtenu par une étape de macération aqueuse dudit
5 tourteau puis une étape de concentration.
- 2/ Extrait de tourteau de graine de noix selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'étape de concentration est effectuée par osmose inverse.
- 10 3/ Extrait de tourteau de graine de noix selon la revendication 1 caractérisé en ce que la macération est effectuée à 4° C.
- 4/ Extrait de tourteau de graine de noix selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'on fait suivre ladite étape de concentration par une étape de séchage ou de
15 lyophilisation, afin d'obtenir une poudre.
- 5/ Extrait de tourteau de graine de noix selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la noix est produite par un noyer commun (*Juglans regia*).
- 20 6/ Extrait de tourteau de graine de noix selon l'une des revendications 1 à 5 utilisé comme protecteur des cellules cutanées vis-à-vis du stress oxydatif induit par les UVB.
- 7/ Extrait de tourteau de graine de noix selon l'une des revendications 1 à 5
25 utilisé comme agent anti-inflammatoire.
- 8/ Extrait de tourteau de graine de noix selon l'une des revendications 1 à 5 utilisé comme agent anti-âge pour lutter contre le vieillissement de la peau.
- 30 9/ Extrait de tourteau de graine de noix selon l'une des revendications 1 à 5 utilisé comme stimulateur de la synthèse des protéines par les cellules de l'épiderme.
- 10/ Extrait de tourteau de graine de noix selon l'une des revendications 1 à 5
35 utilisé comme stimulateur de la synthèse des protéines (et notamment le collagène et les glycosaminoglycanes) par les cellules du derme.

11/ Extrait de tourteau de graine de noix selon l'une des revendications 1 à 5 utilisé comme agent anti-collagénasique.

5 12/ Extrait de tourteau de graine de noix selon l'une des revendications 1 à 5 utilisé comme agent anti-élastasique.

13/ Extrait de tourteau de graine de noix selon l'une des revendications 1 à 5, utilisé pour son activité protectrice vis-à-vis de l'apoptose induite.

10

14/ Composition cosmétique caractérisée en ce qu'elle comprend un extrait de tourteau de graine de noix selon l'une des revendications 1 à 5.

15 15/ Composition cosmétique selon la revendication 14 caractérisée en ce que ledit extrait se présente sous forme d'une solution de concentration comprise entre 10 et 40 g de matière sèche par litre de solvant, avantageusement 30 g/l.

20 16/ Composition cosmétique selon la revendication 15 caractérisée en ce qu'elle contient entre 0,5 et 10 %, avantageusement entre 2 et 5 % en poids de ladite solution.

17/ Procédé de traitement cosmétique pour lutter contre le vieillissement de la peau caractérisé en ce qu'on applique sur la peau une quantité efficace de la composition cosmétique selon l'une des revendications 14 à 16.

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02925

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2207652	A	21-06-1974	NONE	
GB 673501	A		NONE	
WO 9111169	A	08-08-1991	FR 2657256 A	26-07-1991
			AT 96656 T	15-11-1993
			CA 2074485 A	25-07-1991
			DE 69100591 D	09-12-1993
			DE 69100591 T	03-03-1994
			DK 512040 T	03-01-1994
			EP 0512040 A	11-11-1992
			ES 2062767 T	16-12-1994
			JP 5503522 T	10-06-1993

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/02925

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 A61K7/48 A61K35/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STN, Serveur de Bases de Données, Karlsruhe, DE, Fichier Chemical Abstracts, Vol 103, AN=21432 abstract XP002115327	1-17
A	FR 2 207 652 A (MALVOISIN) 21 June 1974 (1974-06-21) example 2	1-17
A	GB 673 501 A (THE V.D.ANDERSON CO.) the whole document	1-17
A	WO 91 11169 A (BONNE ET AL.) 8 August 1991 (1991-08-08) the whole document	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 March 2000

Date of mailing of the international search report

10/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentplan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fischer, J.P.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. : Internationale No

PCT/FR 99/02925

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K7/48 A61K35/78

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	STN, Serveur de Bases de Données, Karlsruhe, DE, Fichier Chemical Abstracts, Vol 103, AN=21432 * résumé * XP002115327	1-17
A	FR 2 207 652 A (MALVOISIN) 21 juin 1974 (1974-06-21) exemple 2	1-17
A	GB 673 501 A (THE V.D.ANDERSON CO.) le document en entier	1-17
A	WO 91 11169 A (BONNE ET AL.) 8 août 1991 (1991-08-08) le document en entier	1-17

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
 "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
 "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
 "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
 "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 mars 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/03/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 6818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fischer, J.P.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den. : Internationale No

PCT/FR 99/02925

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2207652	A	21-06-1974	AUCUN	
GB 673501	A		AUCUN	
WO 9111169	A	08-08-1991	FR 2657256 A	26-07-1991
			AT 96656 T	15-11-1993
			CA 2074485 A	25-07-1991
			DE 69100591 D	09-12-1993
			DE 69100591 T	03-03-1994
			DK 512040 T	03-01-1994
			EP 0512040 A	11-11-1992
			ES 2062767 T	16-12-1994
			JP 5503522 T	10-06-1993